

斑点叉尾鲷鱼骨胶原多肽螯合钙的制备及其特征

陆剑锋*, 孟昌伟, 李进, 官子慧, 林琳, 叶应旺, 姜绍通

(合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽 合肥 230009)

摘要:以斑点叉尾鲷鱼骨酶解胶原多肽液和氯化钙为原料,螯合率为指标,在一定条件下制备胶原多肽螯合钙,并考察温度、pH、时间、多肽与钙的质量比对螯合率的影响。在单因素实验结果的基础上,采用 Box-Behnken 中心组合设计和响应面分析法,确定最佳螯合工艺条件为温度60℃、pH 5.4、时间1.5 h、质量比2:1,此条件下,螯合率达82.53%。紫外吸收和傅里叶变换红外光谱扫描的结果表明,骨胶原多肽与钙形成了螯合物,且其氨基酸组成符合典型的胶原样蛋白特征。

关键词:斑点叉尾鲷; 鱼骨; 胶原多肽; 钙; 螯合率

中图分类号: TS 254.9

文献标志码: A

斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)是一种原产于北美洲的大型淡水鱼类,拥有广泛的国际市场。我国斑点叉尾鲷养殖业发展迅速,2007年产量达14万t左右,被农业部列为重点产业化开发对象^[1]。近年来,随着斑点叉尾鲷鱼片出口量的不断攀升,加工产生的副产物或下脚料(鱼皮、鱼骨、内脏等)逐渐增多,其中鱼骨(包括鱼头部分)占了较大的比例(约40%)。动物骨骼(如牛骨等)通常含有丰富的蛋白、多肽、氨基酸及钙、磷等矿物质,且骨骼蛋白以胶原蛋白为主,约占总蛋白80%左右^[2]。而水产动物胶原蛋白由于其优良的理化性质和生理活性功能,已受到国内外学者的广泛关注^[3]。吴缙等^[4]从斑点叉尾鲷鱼骨中提取和纯化了骨胶原蛋白,并对其特性进行了研究;Nagai等^[5]对多种鱼骨胶原蛋白进行了提取和特性研究,并认为鱼骨胶原蛋白可以广泛应用于食品、药品和化妆品中。

目前,钙质缺乏是全球性的营养问题,我国人民由于以植物性膳食为主,缺钙的现象更加严重,因此补钙成为我国膳食营养研究中的重要课题^[6]。研究表明^[7],动物体内存在着独立的小肽转运系统,是摄入氨基酸的主要途径;当金属离子

和一个小肽螯合后能防止肽的水解;同时因为金属离子在消化道经过胃及小肠中离子的吸收部位时都以螯合态存在,因此吸收速度较快。将骨胶原多肽与钙在一定条件下进行螯合,制备出的骨胶原多肽螯合钙不仅可以补充人体需要的氨基酸和钙,还可以大大提高鱼类等下脚料的附加值。付文雯等^[8]利用胃蛋白酶酶解的酸性环境使牛骨中的钙转变成利于吸收的钙离子,并将胶原蛋白初步水解,再进一步调节pH值后,添加A1398中性蛋白酶使胶原蛋白得到深度水解,同时也促进了两者的螯合。Jung等^[9-10]利用提取的肉食性鱼肠道酶对鳕鱼骨进行酶解,并从酶解液中分离出鱼骨磷酸肽,使其与钙进行螯合,此法得到的螯合钙被认为是一种新颖的营养性食品;之后又对螯合钙进行小鼠实验,证明其可以阻止骨质疏松模型小鼠体内矿物质的流失。

采用碱性蛋白酶和风味蛋白酶“两步酶解法”,可以制备出纯度较高且适用于企业规模化批量生产的胶原多肽水解液^[11]。在此基础上,本文以自制的斑点叉尾鲷鱼骨胶原多肽与氯化钙进行螯合反应,同时结合 Box-Behnken 组合设计和响应面分析法优化斑点叉尾鲷鱼骨胶原多肽钙的

收稿日期:2011-09-19 修回日期:2011-11-02

资助项目:安徽省“十一五”重大科技攻关项目(08010301078);国家大学生创新性实验计划项目(091035955);国家星火计划项目(2008GA710021)

通讯作者:陆剑锋,E-mail:lujf@sibs.ac.cn

制备条件,这不仅可以改善水产动物胶原蛋白资源的营养及功能特性,而且可以减少由于斑点叉尾鲷鱼骨废弃造成的环境污染,也有助于企业产生良好的社会效益和经济效益。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

骨胶原多肽水解液(实验室自制);氯化钙、氢氧化钠、盐酸、无水乙醇等均为分析纯。

1.2 仪器与设备

PHS-3C 精密 pH 计(上海大普仪器有限公司);HH 数显恒温水浴锅(江苏金坛市金城国胜实验仪器厂);DHG-9123J 精密恒温鼓风干燥箱(上海三发科学仪器有限公司);CT15RT 台式高速冷冻离心机(上海天美生化仪器设备工程有限公司);FD-1B-50 冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司);RE 52-86A 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);Nicolet6700 傅里叶红外光谱(美国 Thermo Nicolet 公司);S7130 Amino Acid Reagent Organizer 氨基酸全自动分析仪(德国 Sykam 公司)。

1.3 骨胶原多肽水解液的制备

称取 4 g 或一定量的骨粉(过 40 目筛),先用碱性蛋白酶初步酶解,料液比(W/V)4:50,加酶量 4%,温度 45 ℃,pH 8,酶解 3 h,再用风味蛋白酶在温度 50 ℃,加酶量 4%,pH 7.5,酶解 3 h 的条件下进一步酶解,即通过采用两步酶解法制备胶原多肽水解液^[11]。

1.4 整合实验

工艺流程 骨胶原多肽+氯化钙→调节溶液 pH 值→搅拌→水浴→浓缩→无水乙醇^[12](6 倍体积)→洗涤 2 次→抽滤→真空冷冻干燥。

整合率的测定 待整合反应结束后,准确移取 5 mL 反应液于 50 mL 离心管中,加入 30 mL 无水乙醇,震荡,离心(8 000 r/min,10 min),测定沉淀物(整合钙)中的钙含量(W_0);同时再准确移取 5 mL 反应液,直接测定总钙含量(W_1)。整合率 = $W_0/W_1 \times 100\%$ ^[13]。钙含量的测定参照 GB/T 5009.92-2003(食品中钙的测定)。

1.5 单因素实验设计

单因素实验的基本条件定为温度 70 ℃、时间 1 h、pH 6、质量比 2:1。改变其中一个条件,固定其它条件以分析各单因素对整合率的影响。各因

素水平梯度分别为:温度 30、40、50、60、70、80、90 ℃;时间 0.5、1、1.5、2 h;pH 4.5、5.5、5.5、6;质量比 4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3。每个水平重复试验两次,结果取平均值。

1.6 响应面法优化整合工艺

在单因素试验基础上,采用 Box-Behnken 中心组合方法进行三因素三水平试验设计。以 pH、时间、骨胶原多肽与钙离子质量比 3 个因素为自变量,并以自变量的编码值 X_1 、 X_2 、 X_3 分别代表自变量的高、中、低水平,整合率 Y 为响应值,自变量因素水平及编码见表 1。采用 Design-expert 7.0 软件对数据进行分析。

表 1 Box-Behnken 设计试验因素、水平及编码
Tab. 1 Test factors, levels and codes in Box-Behnken central composite design

自变量因素 independent variables	编码 codes	编码水平 coded levels		
		-1	0	1
pH	X_1	4.75	5.25	5.75
时间/h time	X_2	0.5	1	1.5
质量比 weight ratio	X_3	3:1	2:1	1:1

1.7 氨基酸组成分析

称取冷冻干燥后的样品 7 mg,放入消化管中,加入 8 mL 6 mol/L 的 HCL,充入氮气后旋紧管盖,置于 135 ℃ 烘箱中水解 4 h。水解结束冷却后移至坩埚,于 60 ℃ 水浴锅挥发盐酸,再加入少量双蒸水蒸干,重复两次,用适量 pH 2.20 的磷酸盐缓冲溶液溶解稀释,最后用 0.22 μm 微孔滤膜抽滤,滤液采用氨基酸全自动分析仪进行测定。

1.8 紫外光谱(UV-VIS)分析

取适量冷冻干燥样品,用蒸馏水溶解(同时以蒸馏水作为对照),在 200~400 nm 波长范围内进行紫外扫描,分辨率 1 nm。

1.9 傅里叶红外光谱(FT-IR)分析

取适量冷冻干燥样品,用红外光谱仪对样品进行红外扫描,扫描范围为 4 000~500 cm^{-1} ,采用 Origin 7.0 软件对数据进行分析。

2 结果

2.1 单因素实验

温度对整合率的影响 随着温度的逐渐增加,整合率随之增加,但增幅不大,60 ℃ 时整合率达到最高;当温度升高至 60 ℃ 以上时,整合率随着温度的升高反而下降,表明高温不利于整合反

应的进行。但当温度低于 60 ℃ 时,对螯合率的影响也不显著,所以将螯合温度设定为 60 ℃,不带入后续响应面优化试验(图 1)。

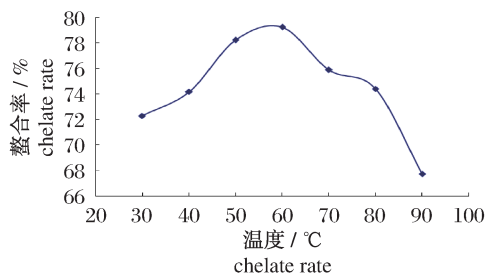


图 1 温度对螯合率的影响

Fig. 1 Effect of temperature on ability of chelation

时间对螯合率的影响 时间对螯合率影响较大。当螯合时间在 0.5~1 h 内,螯合率随着反应时间的延长而快速增加,这也说明螯合反应较为快速。当反应时间为 2 h 时,螯合率达到 79.13%;但反应时间大于 1 h 后,随着时间延长,螯合率增加不明显,基本趋于平缓,故螯合时间以 1 h 为最佳(图 2)。

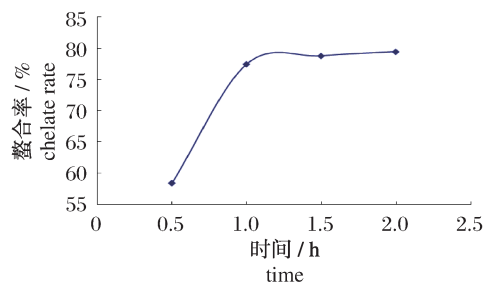


图 2 时间对螯合率的影响

Fig. 2 Effect of time on ability of chelation

pH 对螯合率的影响 螯合率随着 pH 的升高而增大,当 pH 为 5.0~5.5 时,螯合率达到最大,此后又随着 pH 的上升而下降(图 3)。当溶液在 pH 值较低的酸性条件下,大量的 H^+ 将会与 Ca^{2+} 争夺供电子基团,不利于螯合物的生成;当溶液在 pH 值较高的条件下,羟基可能会争夺钙离子而优先生成氢氧化钙沉^[14]。本实验中,当 pH 在 6.0~7.0 时,观察到反应体系中有沉淀慢慢析出。螯合率在 pH 5.0~5.5 附近时达到最大,此时有较多的酸性多肽物质处于等电点附近,受氢离子和羟基影响较小,可以提供充分的供电子基团,从而有利于与钙离子通过配位键形成螯

合物,故螯合反应的最佳 pH 为 5.0~5.5。

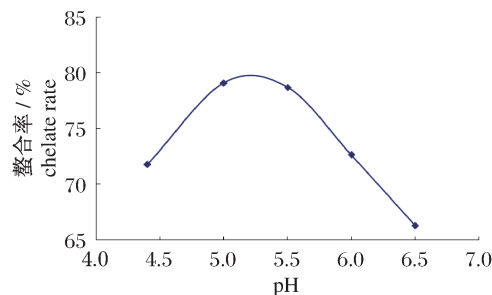


图 3 pH 对螯合率的影响

Fig. 3 Effect of pH on ability of chelation

质量比对螯合率的影响 胶原多肽和钙离子的质量比与螯合率的大小密切相关。随着质量比的增大,螯合率增加,当达到 2:1 时,螯合率最高,质量比再增加,螯合率基本不变。物料的配比是影响金属离子与多肽螯合反应的一个重要因素(图 4)。如果配位比太小,螯合反应即使显著也不能形成稳定的环状结构,即螯合物不稳定;若配位比太高,则导致多肽利用率下降,即造成多肽的浪费,不经济^[15]。综合考虑选择质量比 2:1 较适宜。

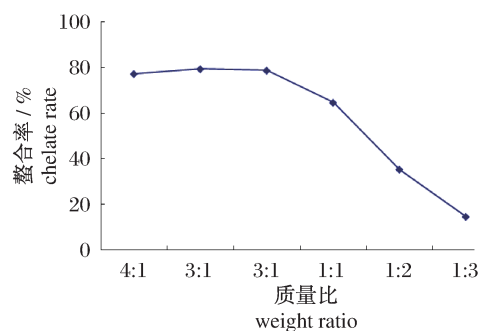


图 4 质量比对螯合率的影响

Fig. 4 Effect of weight ratio on ability of chelation

2.2 响应面分析

本试验安排了 14 个试验点,可分为两类:其一是析因点,自变量取值在 X_1 、 X_2 、 X_3 所构成的三维顶点,共有 12 个析因点;其二为零点,为区域的中心点,零点试验重复 2 次,用以估计试验误差。试验安排及结果见表 2。

对表 2 中的试验数据进行拟合回归,以 pH (X_1)、时间 (X_2)、质量比 (X_3) 为自变量,螯合率 (Y) 为因变量(响应值),建立二次多元回归方程模型:

$$Y = 75.34 - 0.76X_1 + 2.49X_2 + 10.77X_3 + 0.68X_1X_2 + 0.95X_1X_3 + 0.63X_2X_3 - 1.43X_1^2 - 0.52X_2^2 - 5.69X_3^2$$

对回归方程进行方差分析,结果见表3。回归方程中各变量对指标(响应值)影响的显著性,由 F 检验来判定,概率 $P_{(Pr>F)}$ 的值越小,则相应变量的显著程度越高^[16]。由表3可知,回归方程达到极显著水平 ($P < 0.01$),且失拟项不显著 ($P > 0.05$),表明该方程对试验数据拟合较好^[17]。总决定系数 $R^2 = 0.9902$,表明自变量与响应值之间线性关系显著,即该模型预测值与实际试验值拟合较好,因此可利用该回归方程代替试验真实点对结果进行分析^[18]。

回归方程各项系数的显著性分析结果表明,因素 X_3 的线性效应和平方效应对螯合率的影响极显著 ($P < 0.01$), X_2 的线性效应对螯合率的影响显著 ($P < 0.05$)。利用 Design-expert 7.0 软件在设定的因素水平内对回归方程进行数学规划,得到螯合率最高的优化组为 pH 5.4,时间 1.5 h,胶原多肽与钙的质量比为 3:1。此条件下,螯合

率的理论值达到 83.16%。

表2 响应面试验方案及结果

Tab.2 Design and results of response surface experiment

试验号 test numbers	X_1	X_2	X_3	螯合率/% chelate rate
1	-1	-1	0	73.47
2	-1	1	0	77.07
3	1	-1	0	68.34
4	1	1	0	74.67
5	0	-1	-1	76.64
6	0	-1	1	56.60
7	0	1	-1	82.91
8	0	1	1	60.35
9	-1	0	-1	77.79
10	1	0	-1	80.43
11	-1	0	1	57.90
12	1	0	1	56.74
13	0	0	0	74.79
14	0	0	0	75.89

表3 回归方程的方差分析

Tab.3 ANOVA for the fitted quadratic polynomial model

方差来源 source	自由度 d_f	平方和 ss	均方 ms	F	$P_{(Pr>F)}$	显著性 significance
X_1	1	4.58	4.58	1.68	0.2643	
X_2	1	49.75	49.75	18.30	0.0129	*
X_3	1	928.37	928.37	341.52	<0.0001	**
X_1X_2	1	1.86	1.86	0.69	0.4543	
X_1X_3	1	3.61	3.61	1.33	0.3133	
X_2X_3	1	1.59	1.59	0.58	0.4873	
X_1^2	1	6.56	6.56	2.41	0.1954	
X_2^2	1	0.87	0.87	0.32	0.6019	
X_3^2	1	103.74	103.74	38.16	0.0035	**
模型 model	9	1095.31	121.70	44.77	0.0012	**
残差 residual	4	10.87	2.72			
失拟 lack of fit	3	10.27	3.42	5.66	0.2975	
纯误差 pure error	1	0.60	0.60			
总和 total	13	1106.18				

注: * 显著水平为 0.05; ** 极显著水平为 0.01。

Notes: * significant at 0.05% level; ** significant at 0.01% level.

2.3 验证试验

在最佳螯合条件(温度 60 °C, pH 5.4, 时间 1.5 h, 胶原多肽与钙的质量比为 3:1)下,螯合率的理论值达到 83.16%。当胶原多肽与钙的质量比设为 2:1 时,螯合率的理论值虽略低(77.16%),但胶原多肽和钙的螯合利用率较高

(见单因素试验)。故采用质量比为 2:1 进行验证试验,螯合率的实际值达到 82.53%,与理论值相符,且与质量比为 3:1 的理论值相差不大。

2.4 螯合物的氨基酸组成分析

除色氨酸由于酸水解的破坏而未能正常检测外,斑点叉尾鲷鱼骨胶原多肽螯合钙的氨基酸含

量非常丰富,其中以甘氨酸含量最高(22.36%),谷氨酸、丙氨酸、脯氨酸、天冬氨酸和羟脯氨酸含量相对较高,而半胱氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸和组氨酸含量相对较少。因此其符合典型的胶原蛋白氨基酸组成特征^[19],表明螯合试验所用的胶原多肽含量相当高(表4)。

表4 螯合物的氨基酸组成
Tab.4 Proportion of amino acids in collagen polypeptide calcium

氨基酸 amino acids	含量/% content	氨基酸 amino acids	含量/% content
天冬氨酸 Asp	7.02	蛋氨酸 Met	1.67
苏氨酸 Thr	2.95	异亮氨酸 Ile	1.92
丝氨酸 Ser	4.19	亮氨酸 Leu	3.46
谷氨酸 Glu	11.28	酪氨酸 Tyr	1.28
甘氨酸 Gly	22.36	苯丙氨酸 Phe	2.23
丙氨酸 Ala	11.04	组氨酸 His	2.21
半胱氨酸 Cys	2.07	赖氨酸 Lys	4.13
缬氨酸 Val	2.41	精氨酸 Arg	4.65
脯氨酸 Pro	8.85	羟脯氨酸 Hyp	6.30

注:由于酸水解导致 Trp 被破坏,所以未能检测到 Trp。

Notes: Tryptophan was not detected because it was destroyed during acid hydrolysis.

2.5 螯合物的紫外吸收光谱分析

在螯合物中,不仅过渡金属离子会吸收可见(或紫外)区的某一部分波长的光而发生跃迁,配合体内部也可能因吸收可见(或紫外)区的光而发生电子的跃迁。形成螯合物时中央离子与配位体的键合使配位体内部有关轨道的能量改变,因此螯合物中的配合体内部电子的跃迁与游离配位体内部电子的跃迁时要求的能量不相同,即吸收光的波长不相同^[20]。

周元臻等^[21]研究了壳聚糖与 Ca^{2+} 之间的配合作用,结果表明其产物的紫外吸收光谱发生了红移。同时指出在反应过程中可以根据螯合物最大吸收峰的大小来判断反应程度,而利用分光光度法还可以测定螯合物的稳定常数,判断螯合物的配位比。由图5可知,螯合后的骨胶原多肽(即胶原多肽螯合钙)的紫外吸收光谱同样存在红移现象,表明有新物质生成,这也证实骨胶原多肽与钙离子之间可能发生了螯合反应。

2.6 螯合物的红外吸收光谱分析

在胶原多肽溶液中主要是氨基酸残基之间的酰胺键,也有少量的末端或侧链氨基和羧基存在,

因此在红外光谱中存在氨基的伸缩振动、变角振动和羧基的伸缩振动等吸收峰;而当胶原多肽与 Ca^{2+} 螯合后,必然会引起其吸收峰位的偏移或变化^[22]。

由图6可知,骨胶原多肽红外光谱图的特征区中, $-\text{NH}_2$ 的吸收峰在 3200 cm^{-1} , 是由 $\text{N}-\text{H}$ 的伸缩振动引起; 1641.12 cm^{-1} 属于酰胺 I 带, 是由 $\text{C}=\text{O}$ 的伸缩振动引起; 1567.84 cm^{-1} 属于酰胺 II 带, 是由 $\text{N}-\text{H}$ 的变形振动引起; 1139.72 cm^{-1} 处出现 (PtNH_2) 吸收峰; 622.89 cm^{-1} 处则是由 $\text{N}-\text{H}$ 面外变形振动引起。加入钙离子后,氨基的伸缩振动吸收峰出现偏移,向高波位移动 55 个波数,且吸收峰变强。酰胺 I 带吸收变得很弱,可能是由于和钙结合后 $\text{C}=\text{O}$ 的伸缩振动受到遏制,这意味着 $\text{C}=\text{O}$ 和钙离子之间存在某种化学作用,配合键形成的可能性最大^[23]。在 1139.72 cm^{-1} 处的 (PtNH_2) 吸收峰向低波位发生了偏移,且吸收峰增强,推测 Ca^{2+} 与 $-\text{NH}_2$ 之间存在较强的结合作用^[24],这也与米蛋白态锌的红外吸收光谱相似^[25]。由红外吸收峰的偏移或变化,进一步证实骨胶原多肽和钙离子之间形成了螯合物。

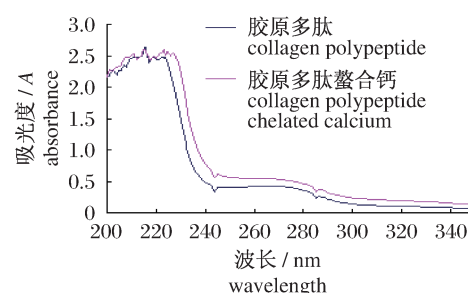


图5 紫外吸收光谱图

Fig.5 UV-VIS spectra

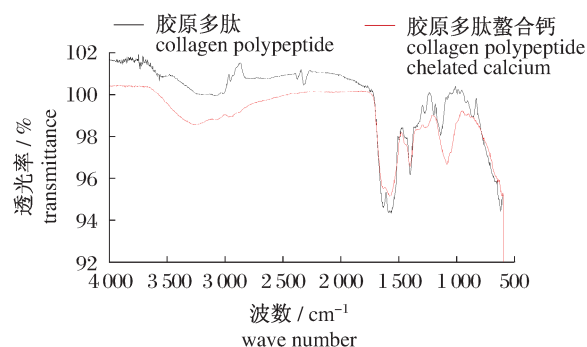


图6 傅里叶红外光谱图

Fig.6 FT-IR spectrum

3 结论

通过单因素和响应面优化实验,得到胶原多肽液和钙离子的最佳螯合条件为温度 60 ℃, pH 5.4, 时间 1.5 h, 胶原多肽与钙的配比为 2:1, 此条件下的钙螯合率为 82.53%。对螯合物进行氨基酸分析,其甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸和羟脯氨酸含量较高,符合典型的胶原样蛋白氨基酸组成特征,即该螯合物在补充钙的同时也能起到补充胶原蛋白的作用。对骨胶原多肽及其钙螯合物进行紫外吸收和傅里叶变换红外光谱扫描,结果表明,螯合前后两者在化学结构上存在一定的变化,较好地证明了钙螯合物的形成。

参考文献:

- [1] 张伟伟,陆剑锋,焦道龙,等. 钾法提取斑点叉尾鲷内脏油的工艺研究[J]. 食品科学,2009,30(24):42-46.
- [2] 胡军景,刘景圣,张大力,等. 复合酶分步酶解法提取牛骨胶原蛋白工艺的研究[J]. 肉类研究,2010,24(1):34-36.
- [3] 焦道龙,陆剑锋,张伟伟,等. 水产动物胶原蛋白的研究现状及发展趋势[J]. 食品科学,2009,30(17):334-338.
- [4] 吴缙,陈舜胜. 斑点叉尾鲷鱼骨制取胶原蛋白和骨粉的试验研究[J]. 南方水产,2009,5(3):36-40.
- [5] Nagai T, Suzuki N. Preparation and characterization of several fish bone collagens[J]. Journal of Food Biochemistry,2000,5(24):427-436.
- [6] 宋俊梅,曲静然. 促进骨钙生物可利用性的研究[J]. 食品科技,2002,(2):60-62.
- [7] 谢静,李宗军. 补钙理论创新—胶原多肽与钙结合物[J]. 国际中医中药杂志,2008,30(1):69-71.
- [8] 付文雯,马美湖,蔡朝霞. 牛骨蛋白分步酶解制取胶原多肽螯合钙的研究[J]. 食品工业,2010,(1):1-4.
- [9] Jung W K, Park P J, Byun H G, et al. Preparation of hoki (*Johnius belangerii*) bone oligophosphopeptide with a high affinity to calcium by carnivorous intestine crude proteinase[J]. Food Chemistry,2005,91(2):333-340.
- [10] Jung W K, Lee B J, Kim S K. Fish-bone peptide increases calcium solubility and bioavailability in ovariectomised rats[J]. British Journal of Nutrition,2006,95(1):124-128.
- [11] 孟昌伟,陆剑锋,宫子慧,等. 斑点叉尾鲷鱼骨胶原多肽的制备工艺研究[J]. 肉类工业,2011(9):35-39.
- [12] Ramos J M, Versiane O, Felcman J, et al. FT-IR vibrational spectrum and DFT:B3LYP/6-31G structure and vibrational analysis of guanidinoaceticserinenickel (II) complex: [Ni(GAA)(Ser)] [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy,2007,67(3-4):1037-1045.
- [13] 张红漫,仪明君,陆小华,等. 复合氨基酸铜螯合物的研究[J]. 氨基酸和生物资源,2002,24(2):37-40.
- [14] 孙莉洁,梁金钟. 响应面法优化大豆肽与钙离子螯合的研究[J]. 中国粮油学报,2010,25(1):22-27.
- [15] 杨姗姗. 罗非鱼皮多肽锌螯合盐的制备及性质研究[D]. 南昌:南昌大学,2008.
- [16] Amin N A S, Anggoro D D. Optimization of direct conversion of methane to liquid fuels over Cu loaded W/ZSM-5 catalyst [J]. Fuel,2003,83(4-5):487-494.
- [17] Wang L Z, Yang B, Du X Q, et al. Optimization of conditions for extraction of acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) by response surface methodology [J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies,2008,9(4):604-607.
- [18] Sen R, Swaminathan T. Application of response-surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin [J]. Applied Microbiology and Biotechnology,1997,47(4):358-363.
- [19] Bae I, Osatomi K, Yoshida A, et al. Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilised fishes[J]. Food Chemistry,2008,108(1):49-54.
- [20] 管海跃. 甘氨酸微量元素螯合物的合成与表征研究[D]. 杭州:浙江大学,2007.
- [21] 周元臻,魏永锋,张维平,等. 壳聚糖-Ca(II)配位聚合物的合成及其性能表征. 食品科学,2003,24(1):36-39.
- [22] 付文雯,马美湖,蔡朝霞. 牛骨蛋白酶解制取肽钙的研究进展[J]. 食品与发酵科技,2009,45(1):1-5.
- [23] 祝德义. 利用灰碱皮废料制备胶原多肽钙[D]. 济南:山东轻工业学院,2008.
- [24] 夏松养,谢超,霍建聪,等. 鱼蛋白酶水解物的钙螯合修饰及其功能活性[J]. 水产学报,2008,32(3):471-476.
- [25] 张全才. 米蛋白态锌的制备工艺及产品特性研究[D]. 南昌:南昌大学,2007.

Preparation and characterization of collagen polypeptide chelated calcium from fish bone powder of channel catfish (*Ictalurus punctatus*)

LU Jian-feng^{*}, MENG Chang-wei, LI Jin, GONG Zi-hui, LIN Lin, YE Ying-wang, JIANG Shao-tong
(College of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: Calcium is essential for living organisms. Even with an apparently sufficient intake of dietary calcium, there is some concern that inadequate calcium is absorbed by the small intestine, due to precipitation of insoluble calcium salts in the neutral to slightly basic intestinal lumen. Some studies revealed that peptides have the capacity to chelate Ca and to prevent the precipitation of insoluble calcium salts, thereby increasing the amount of soluble Ca availability for absorption across the mucosa. However, the mechanism and degree of calcium ion binding are still unclear. In this paper, the combinations between collagen polypeptide (from the enzymatic hydrolysate of channel catfish bone powder) and calcium ion were studied by measuring chelate rate. On the basis of results of single-factor experiments, the Box-Behnken central composite design and response surface method were adopted to obtain the optimum conditions for chelation. The optimal chelate conditions were determined as: chelate temperature 60 °C, chelate pH 5.4, chelate time 1.5 h and ratio of collagen polypeptide to calcium 2:1 (W/W). Under the optimized conditions, the chelate rate of Ca-collagen polypeptide could reach 82.53%. The formation of Ca-collagen polypeptide chelate was confirmed by the UV-VIS and FT-IR spectra. The characterization of amino acid composition of the chelate was similar to typical collagen-like protein. This research provides a practical guideline and a theoretical basis for fully utilizing fish bone protein resources and developing the deep processed products.

Key words: *Ictalurus punctatus*; fish bone; collagen polypeptide; calcium; chelate rate

Corresponding author: LU Jian-feng. E-mail: lujf@sibs.ac.cn